

# アブラナ科植物における自家不和合性・自家和合性の生理遺伝的研究

著者	岡崎 桂一
号	344
発行年	1985
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/16245">http://hdl.handle.net/10097/16245</a>

氏 名 (本籍)	おか 岡	ざき 崎	けい 桂	いち 一
学 位 の 種 類	農	学	博	士
学 位 記 番 号	農 博 第	3 4 4	号	
学位授与年月日	昭和 6 1 年 3 月 2 5 日			
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当			
研 究 科 専 攻	東北大学大学院農学研究科 (博士課程) 農 学 専 攻			
学 位 論 文 題 目	アブラナ科植物における自家不和合性・ 自家和合性の生理遺伝的研究			

論文審査委員 (主 査)

教授 日向 康 吉	教授 堀	裕
	教授 江 原 淑 夫	

# 論文内容要旨

## 序 言

自家不和合性とは、生殖機能が完全な被子植物において、自家受粉の場合、雌ずい中で花粉管の伸長停止がおり自殖種子が得られない現象である。アブラナ科の自家不和合性植物を自家受粉した場合、花粉管は柱頭乳頭細胞の細胞壁に侵入できない。遺伝子分析の結果、胞子体的に働く複対立遺伝子  $S^i$  ( $i = 1, 2 \dots$ ) が関与し、花粉と柱頭の  $S$  遺伝子の表現型が一致した場合に不和合性となると説明されている。近年、 $S$  遺伝子と共に遺伝する  $S$  糖タンパク質が柱頭に見つかり、その遺伝行動が  $S$  遺伝子と全く同じであること、成熟柱頭にのみ存在することなどの理由で、花粉・柱頭間の認識に関与する物質の最有力候補とされている。本  $S$  糖タンパク質の性格を更に明かにし、それを用いて自家不和合性の機構を明かにすることが必要と思われる。

本研究では、まず  $S$  糖タンパク質と  $S$  遺伝子との相互関係について、遺伝子分析、血清反応の面から検討し、その乳頭細胞への局在性、 $S$  ホモ系統による含量の差異を検討した（第1章、2章）。次いでこの  $S$  糖タンパク質をマーカーとして用いて、自家和合性の遺伝現象を明かにする一方（第3章）、高温による自家不和合性打破の研究を行ない（第4章）、自家不和合性機構について推論を行なった。

## 第1章、 $S$ 遺伝子と $S$ 糖タンパク質の関係

——日本のダイコン品種の場合——

従来の  $S$  糖タンパク質の検出は、 $S$  遺伝子既知の材料を用いて行なったものが多かった。本研究では一般に市販されている材料について  $S$  遺伝子と  $S$  糖タンパク質がどのようになっているかを明かにすることを目的とした。市販一代雄種品種 29 品種を用い、これらから任意に一個体をとって自殖し、その後代の分離から、 $S$  遺伝子と  $S$  糖タンパク質の関係を調べた。主要 29 品種中 20 品種については不和合性について明瞭な分離が認められ、全て胞子体型一座位の  $S$  遺伝子で説明できた (Table 1-1, 1-2)。残りの 9 品種中 7 品種では分離が認められず、2 品種では複雑な分離を示した。

分析できた 20 品種、40  $S$  遺伝子中、11 について  $S$  糖タンパク質が検出された (Table 1-2, Fig. 1-1)。11 の  $S$  遺伝子は  $S$  糖タンパク質の等電点によって 5 つのグループに分けられ、それらは二面交配から推定した  $S$  遺伝子の異同性と例外なく一致した (Table 1-3)。これらのことは  $S$  糖タンパク質と  $S$  遺伝子の遺伝はきわめて密接なものであることを示している。

以上のことから (1)  $S$  糖タンパク質の見つかっている  $S$  遺伝子については、 $S$  糖タンパク質の分析によって  $S$  遺伝子を推定できること、(2) しかし  $S$  糖タンパク質が同定できない  $S$  遺伝子も相当数存在し、この点について検討を要することがわかった。

## 第2章 $S$ 糖タンパク質の検出法の改良と局在性

### 1、イムノ・ブロット法を用いたSタンパク質の同定法の検討

本実験では柱頭たんぱく質を等電点電気泳動法を用いて分画した後、イムノ・ブロット法によってS糖タンパク質検出感度を高める方法を試みた。その結果、精製S糖タンパク質を用いて作成した抗体でも柱頭の多数のタンパク質と交差反応をすることがわかった。次にS糖タンパク質抗体を花粉の抽出液で予め吸収して反応に供すると、S糖タンパク質が相対的に強く反応し、高感度でS糖タンパク質が同定できることを示した。このとき、これまで用いていたクマシーブルー染色や銀染色などのタンパク質分析法では、そのS糖タンパク質が検出できないS遺伝子についても、S糖タンパク質バンドが検出できることがわかった (Fig. 2-1)。

本実験の結果から、精製抗原で作成したS糖タンパク質抗体は、多数のタンパク質と反応すること、またSホモ系統によってS糖タンパク質含量に著しい差のあることがわかった。 2、S糖タンパク質の局在性

S糖タンパク質が柱頭のどの部分にあるかを明かにするため、蛍光抗体法によってその局在性を検討した。S糖タンパク質抗体をそのまま用いた場合、前実験でも示されたように、非特異蛍光が柱頭組織全体に見られた。しかし、子房摩砕液で吸収した抗体を用いると、蛍光部分は柱頭乳頭細胞と維管束にかぎられた。このことからS糖タンパク質は柱頭乳頭細胞に局在するものと考えた。

## 第3章 自家和合性の遺伝子分析

### ——自家不和合性の遺伝的解消——

本実験ではS遺伝子とS糖タンパク質既知の材料を不和合の親に用いて、自家和合個体と交雑し、その雑種後代の和合性の分離を自家受粉及び両親系統との相互交配 (テスト交配) から推定し、自家和合性に関与する遺伝子を分析した。

#### 1、イエローサルソンの場合

イエローサルソンはインドで栽培される自家和合系統 (C6とする) で、B. campestris var. yellow sarsonと分類されている。本系統とS遺伝子既知のB. campestris 2系統 (S8、S12) を交配し実験に供した。

テスト交配の結果、後代はⅠ、Ⅱ、Ⅲのタイプに分離した (Table 3-1)。すなわち、S糖タンパク質が認められず、すべてのテスト交配で和合となるもの (Ⅰ)、S糖タンパク質があり、不和合親を母本とした場合だけ不和合となるもの (Ⅱ)、S糖タンパク質があり、不和合系統との相互交配と自家受粉のときに不和合となるもの (Ⅲ) であった。このような分離は以下の仮定で説明できた。

1) S遺伝子と独立に遺伝する遺伝子対M:mが存在する。

2) 柱頭側において、m遺伝子はS に対し劣性上位の性質を有する。すなわち、S-mm遺伝子型では柱頭側の不和合性を抑制し和合性にする。

3) 花粉において  $m$  遺伝子は作用しない。

4) イエローサルソンの  $S$  遺伝子の活性は非常に弱い。

5) 不和合系統の遺伝子型を  $S^i S^i MM$ 、イエローサルソンの遺伝子型を  $S^C S^C m$  と推定する。

この仮定の下での分離様式は Table 3-2 のようになり、また分離比を検定すると理論値は観察値とよく適合した。Ⅲ'の型は、イエローサルソンの  $S$  遺伝子が低いながら活性を示すこともあるとすれば理解できる。なお、第1章のような自家不和合性の場合に、花粉管の侵入阻害が起こっている乳頭細胞にはカロースが形成される。しかし、本実験ではカロースが形成された乳頭細胞にも花粉管が侵入している場合が時折見られた。

本実験の結果から、イエローサルソンの自家和合性には、柱頭側でのみ発現する劣性上位遺伝子が関与していることがわかった。また、カロース形成を自家花粉の認識の結果だと仮定すると、本実験の場合認識反応は起こっているが、花粉管停止反応の不生起のため和合性が生じたと推測できる。

## 2. ミズナの自家和合個体の場合

本実験では、ミズナ不和合集団中から、見出だされた自家和合個体 ( $Mi$ ) の遺伝分析を行ない、イエローサルソンの場合が一般的なもののか否かについて検討した。イエローサルソンの場合と同じ方法で検討したところ、雑種後代は4つの型に分離した (Table 3-3)。そのうち3つはイエローサルソンの場合と同じである。第Ⅳの型は  $S^i$  糖タンパク質が検出されず不和合親との相互交配で和合性であるが、自家受粉のとき不和合性であった。

これらの現象は、イエローサルソンの場合と同様な遺伝子モデルで説明できるが、但しミズナの場合には  $S$  遺伝子に活性があると仮定しなければならない。このことは、ミズナの自家和合性個体が不和合集団から見つかったことから考えると当然のことでもある。

以上二つの実験を通して、次のような結論を得た。

(A) 自家不和合性の発現には補足的に働く遺伝子が柱頭側に必要である。

(B) この遺伝子が柱頭側で劣性ホモ  $mm$  となったときに自家和合個体が得られる。

(C) 従って、自家不和合性の発現には柱頭が重要な働きをしている。

(D) 自家和合系統の出現には、まず集団中に  $mm$  遺伝子が集積し、集団の自家和合性が高まり、劣性の劣悪な遺伝子が除去され、次いで何等かの条件あるいは人為的な淘汰によって自家和合性集団が成立すると考えられる。

## 第4章 高温による自家不和合性の解消

雌ずいの役割を更に明かにするために高温処理による自家不和合性消去の実験を行なった。雌ずい側を  $40^{\circ}\text{C}$  15分間処理することによって自家不和合性が解消された (Table 4-1)。この条件では花粉は死滅する。さらに温度を  $50^{\circ}\text{C}$  にすると自家不和合性は消失するが、花柱組織の変性も起こるらしく、花粉管は花柱組織に侵入し得ない。 $35^{\circ}\text{C}$  の温

度では不和合性の解消は認められない。これらのことは、B. campestris, B. oleracea, R. sativusに共通して見られた。

次に40℃15分間処理を行なった雌ずいを一定時間室温に置くと自家不和合性が回復する現象を認めた。この回復の能力には花を採取するときの植物体の生育温度が影響し、低温ほどよく回復した (Table 4-2)。なお、裂開やくの処理や雌ずいの50℃の温度では回復が認められなかった。

以上の処理が柱頭乳頭細胞の微細構造にどのような影響を与えるかを、電子顕微鏡によって観察した。40℃15分間処理した乳頭細胞では、原形質膜の歪曲、液胞の肥大等の異常が認められた。自家不和合性が回復したと思われる雌ずいを観察すると、液胞の肥大はそのまま認められたが、原形質膜は正常に復していた。この間のS糖タンパク質の挙動について調べると、40℃と50℃の温度ではS糖タンパク質に変化はなく、60℃処理ではS糖タンパク質が認められなかった。

以上の結果から、高温処理による自家不和合性の打破は、乳頭細胞内の微細構造が高温により破壊され代謝が正常に行なわれなかったためと思われる。逆にいえば、不和合性の発現には乳頭細胞の代謝が正常に行なわれていることが前提になっていると言える。

## 結 語

本研究ではS遺伝子とS糖タンパク質が遺伝的に極めて密接な関係にあることを、まず市販のダイコン品種を用いて確かめ、またS糖タンパク質の量はS遺伝子によって異なることを示した。またこのS糖タンパク質は乳頭細胞に局在することも確かめた。そして、S糖タンパク質をマーカーとして用いながら自家不和合性に関する遺伝子を明かにし、一方高温処理による自家不和合性の解消の現象を掘下げた。これらの結果から考えると、柱頭乳頭細胞は自家不和合性の発現にとって、認識作用を行なうばかりでなく、それに引き続く花粉管侵入抑制を発現するためにも極めて重要な組織であると言える。そして、柱頭乳頭細胞の代謝、特にM遺伝子で示される代謝が正常に働くことが自家不和合性発現の必須条件であることを示した。以上の知見をもとにして、自家不和合性の機構を以下のように推論した。すなわち、花粉の認識物質とS糖タンパク質間で認識反応が行なわれ、この結果としてカロース沈着反応が起こるものであろう。この認識反応のみによっては、花粉管伸長抑制は起こらない。認識反応の結果は細胞内に伝えられ、M遺伝子関与の代謝が働き花粉管の侵入阻害反応が起こる。この代謝は、高温処理によっても阻害される。

Table 1-1. Data of the diallel pollinations in W 11 family and the differential bands in each plant.

Male														S-geno- types	Band	
Female		1	5	8	7	14	16	2	3	9	12	13	17		B1	B2
	1	-	-	-	+	+	+	-	-					S <sup>a</sup> S <sup>a</sup>	+	-
	5	-	-	-	+	+	+	-	-						+	-
	8	-	-	-	+	+	+	-	-						+	-
	7	+	+	+	-	-	-	-	-					S <sup>b</sup> S <sup>b</sup>	-	+
	14	+	+	+	-	-	-	-	-						-	+
	16	+	+	+	-	-	-	-	-						-	+
	2	-	-	-	-	-	-	-	-					S <sup>a</sup> S <sup>b</sup>	+	+
	3	-	-	-	-	+	-	-	-						+	+
	9	-	±	-	-	-	-	-	-						+	+
	12	-	-	-	-	-	-	-	-						+	+
	13	-	-	-	-	-	-	-	-						+	+
	17	-	-	-	-	-	-	-	-						+	+

+ : Many pollen tubes penetrating. ± : 5-20 pollen tubes penetrating. - : A few or no pollen tubes penetrating. The presence (+) or absence (-) of the specific band is also indicated. In this family S<sup>a</sup> and S<sup>b</sup> of the two S alleles are co-dominant in stigmas and pollen.

Table 1-2. Summarized data of S allele analysis for the 20 F<sub>1</sub>-hybrid varieties of Japanese radish. S allelic interaction, their glycoproteins and their pI point are presented.

Family	Allelic interaction		S-glycoprotein		pI	
	Pollen	Stigma	S <sup>a</sup>	S <sup>b</sup>	S <sup>a</sup>	S <sup>b</sup>
W 2	S <sup>a</sup> =S <sup>b</sup>	S <sup>a</sup> =S <sup>b</sup>	-	-		
7	=	=	-	-		
8	=	=	-	-		
9	=	=	+	-	7.6	
10	<	=	-	-		
11	=	=	+	+	7.9	8.2
12	<	=	-	-		
13	<	=	-	-		
14	=	=	-	+		8.4
17	<	=	-	-		
19	>	=	-	-		
22	=	<	+	+	6.7	7.9
23	<	=	-	+		7.9
25	=	=	-	-		
26	<	=	-	-		
27	=	=	-	-		
28	<	=	-	-		
30	=	=	-	+		7.9
T 3	<	=	-	+		8.2
6	=	<	+	+	7.9	7.6

S<sup>a</sup> and S<sup>b</sup> are either of the two S alleles in a family. = : Co-dominance.  
< : Dominance, i.e. S<sup>a</sup><S<sup>b</sup>, S<sup>b</sup> is dominant over S<sup>a</sup>. + : Presence of S-glycoprotein. - : Not observed.

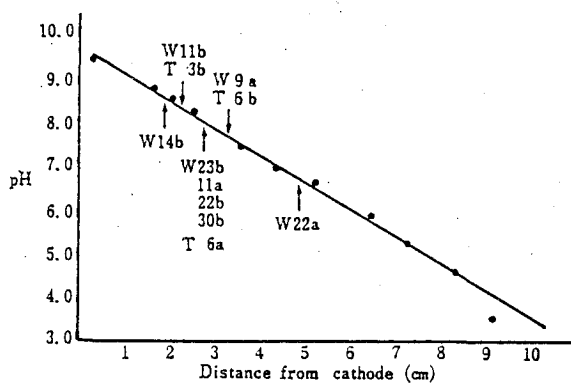


Fig. 1-1. pH gradient profile against the distance from cathode due to pI calibration kit. Arrows indicate the pI points of S-glycoproteins that were specified to respective S-homozygotes.

Table 1-3. Data of diallel pollination between S-homozygotes whose S-glycoproteins were specified.

Male Female	W 11a	W 22b	W 30b	T 6a	W 9a	T 6b	W 11b	T 3b	W 14b	W 23b	W 22a	pI
W 11a(B)	-	-	-	-				+				
W 22b(B)	-	-	-	-	+	+		+		+	+	7.9
W 30b(B)	-	-	-	-	+	+		+			+	
T 6a(B)	-	-	-	-		+					+	
W 9a(D)	+	+	+	+	-	-		+		+		7.6
T 6b(B)	+	+	+	+	-	-		+		+	+	
W 11b(B)												8.2
T 3b(B)	+	+	+	+	+	+		-		+	+	
W 14b(B)	+	+	+	+	+	+		+	-		+	8.4
W 23b(F)	+		+					+				7.9
W 22a(B)	+	+	+	+	+	+		+		+	-	6.7

Scores + or - are the same as in Table 1. W 11 a and W 11 b are the S homozygotes isolated from W 11 family, so on. Alphabet in parentheses indicates the company from where the  $F_1$  varieties are released. pI : Isoelectric point of S-glycoproteins.



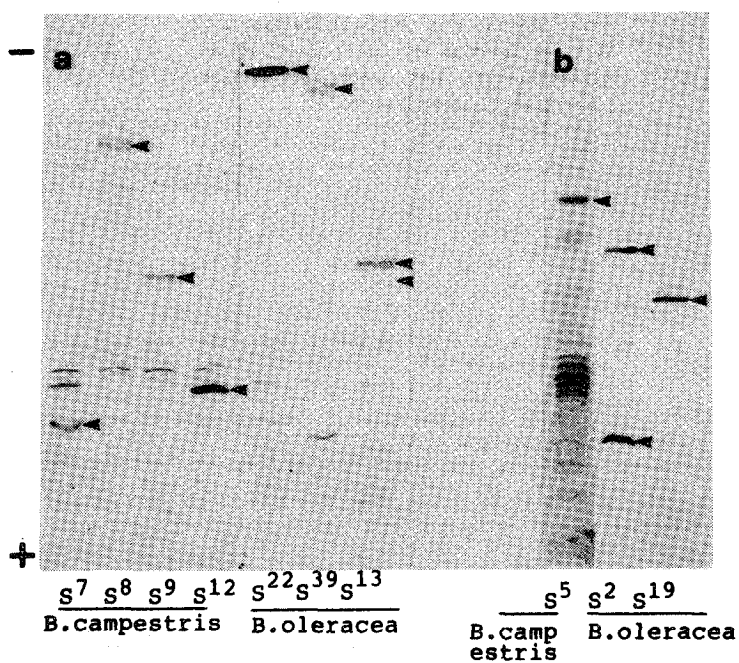


Fig. 2-1. Stigma proteins reacted with the absorbed Anti-CS<sup>7</sup> by means of immunoblotting method. (a) Strains which have already known S-glycoproteins. (b) Strains which newly detected S-glycoproteins by immunoblotting method. Bands with arrows indicated S-glycoproteins.

Table 3-1. Incompatibility behaviour of the hybrid progenies of C6 x S<sup>8</sup>.

Progenies	No. of plants	Test cross					S <sup>8</sup> band	Types
		x S <sup>8</sup>	S <sup>8</sup> x	self	x C6	C6 x		
F1	5	-	-	-	+	+	+	III
F2	4	+	+	+	+	+	-	I
	3	+	-	+	+	+	+	II
	6	-	-	-	+	+	+	III
F1 x C6	2	+	-	+	+	+	+	II
F1 x S <sup>8</sup>	5	-	-	-	+	+	+	III
	2	-	-	-	-	+	+	III'

x S<sup>8</sup> (x C6): Pistils of progeny plants were test crossed with the S<sup>8</sup> pollen (with the yellow sarson pollen)

S<sup>8</sup> x (C6x): Pollen of progeny plants was examined on the S<sup>8</sup> stigma (on the yellow sarson stigma).

+ : Many pollen tubes penetrate the stigma papilla.

- : A few or no pollen tubes penetrate the stigma papilla.

Table 3-2. Expected incompatibility behaviour of hybrid progenies from the cross between self-incompatible (*B. campestris*) and self-compatible (yellow sarson) stains under the recessive epistatic gene (m) assumption.

Test cross:								
Progenies	Phenotypes	Test cross					S <sup>i</sup> band	
		x S <sup>i</sup>	S <sup>i</sup> x	self	x C6	C6 x		
F1	S <sup>i</sup> M	-	-	-	+	+	+	
F2	I: S <sup>i</sup> m, S <sup>C</sup> M	+	+	+	+	+	-	
	II: S <sup>i</sup> m	+	-	+	+	+	+	
	III: S <sup>i</sup> M	-	-	-	+	+	+	

Table 3-3. Incompatibility behavior of the hybrid progenies of Mi x S<sup>8</sup>

Progenies	No. of plants	Test cross					S <sup>8</sup> band	Types
		x S <sup>8</sup>	S <sup>8</sup> x	self	x Mi	Mi x		
F1	9	-	-	-			+	IV
F2	1	++	++	+		+	-	I
	2	+	-	+		+	+	II
	11	-	-	-		+	+	III
	5	++	++	-		+	-	IV
F1 x Mi	3	++	++	+	+	+	-	I
	2	++	-	++	++	+	+	II
	6	-	-	-	-	+	+	III
	6	+	++	-	-	+	-	IV
F1 x S <sup>8</sup>	23	-	-	-		+	+	IV

Table 4-1. Effect of high temperature treatment of pistils.

Treatment		Turnip				Radish			
Temperature	Time	Self		Cross		Self		Cross	
		Stigma	Style	Stigma	Style	Stigma	Style	Stigma	Style
Control		-	-	++	++	-	-	++	++
35°C	15min.	-	-	++	++	-	-	++	++
40	15	++	++	++	++	++	++	++	++
	10	±	±	++	++				
	5	-	-						
50	15	++	-	++	-	++	-	++	-
	10	++	-	++	-				
	5	±	±	+	±				

Three pistils were used in each treatment. ++:Abundant pollen tubes were observed in a stigma or style. +:20-50 pollen tubes were observed. ±:Number of pollen tubes were 5-20. -:A few or no pollen tubes were observed.

Table 4-2. Effect of growth temperature of *Brassica campestris* L. on restoration of self-incompatibility of pistils after 40°C, 15min treatment.

Days after plants transferred in growth chambers.	Pollination time after 40°C, 15 min treatment.	Pollen tube penetration		
		Field condition		
0 days	0	++		
	2 h	-		
	4 h	-		
2 days		Temperature of growth chamber		
		15 - 5°C	20 - 10°C	25-15°C
	0	++	++	++
2 days	2 h	-	++	++
	4 h	-	++	++
4 days	0	++	++	++
	2 h	-	++	++
	4 h	-	++	++
7 days	0	++	++	++
	2 h	-	++	++
	4 h	-	++	++

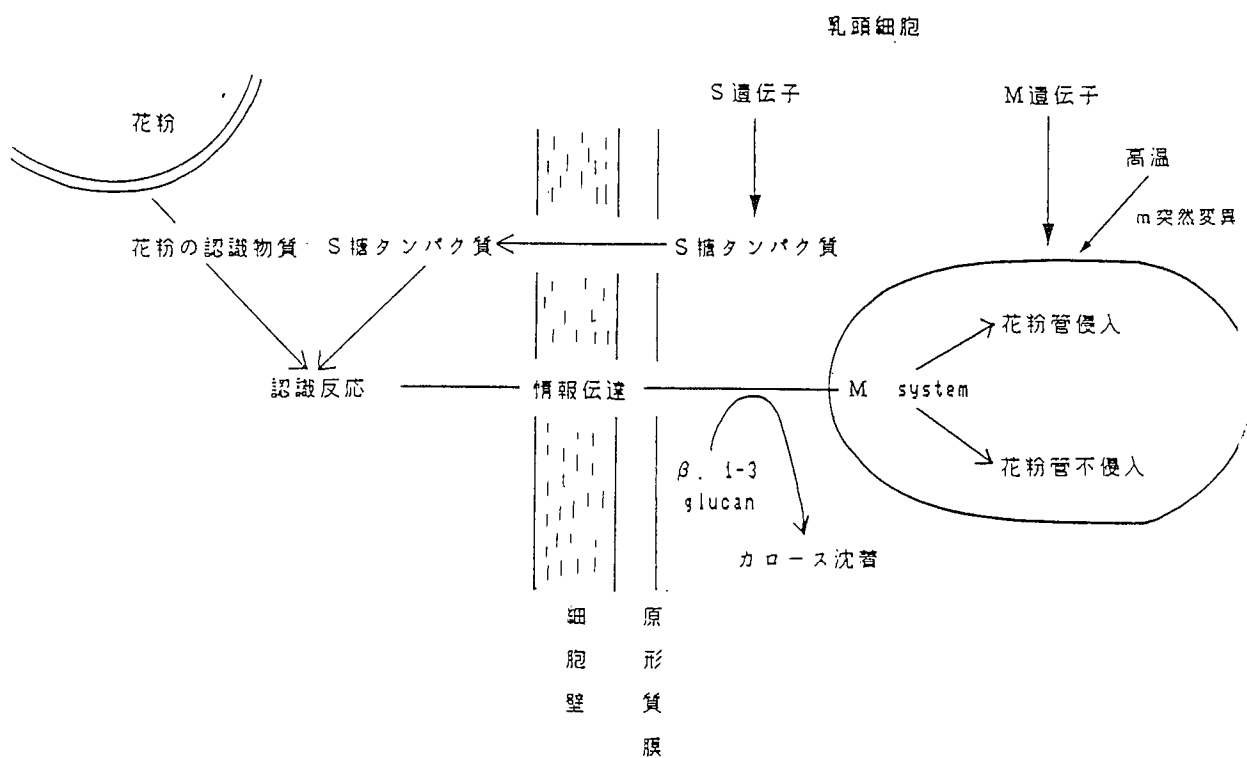


図 自家不和合性機構のモデル

## 審 査 結 果 の 要 旨

アブラナ科植物の自家不和合性現象には、自・他花粉の認識反応と、花粉管の柱頭への不侵入現象が含まれている。本研究はこの両現象の関係を遺伝生理的に検討したものである。

本研究第一章ではまずS遺伝子とその認識作用物質の候補とされている柱頭S糖たんぱく質の関係を、日本の市販一代雑種ダイコン品種29品種について検討し、明瞭に遺伝子分析のできた20品種40遺伝子中、11遺伝子についてS糖たんぱく質が認められること、そのS遺伝子との関連性には遺伝的に例外がない事を検証した。

次いで柱頭中にS糖たんぱく質が認められないS遺伝子が多数存在していることを考慮し、S糖たんぱく質の同定にイムノブロット法を適用してS糖たんぱく質含量にはS遺伝子によって大幅な差があることを明らかにした。また、S糖たんぱく質は柱頭乳頭細胞に存在することを蛍光抗体法によって示した。これらの実験はS糖たんぱく質がS遺伝子の成生する物質であることを支持している。

第三章ではS糖たんぱく質をS遺伝子のマーカーとして利用して、自家和合性の遺伝解析を行った。材料として、インドで栽培される自家和合系統と我国の自家不和合性ミズナ中に見出された自家和合個体を用い、これとS遺伝子既知の自家不和合系統と交雑し、雑種後代の遺伝様式を検討した。その結果、両材料共に原則的に同じ遺伝子で自家和合性が決定されていることがわかった。すなわち、(A)自家不和合性の発現にはS遺伝子と独立で補足的に働く遺伝子、Mが柱頭側に必要なこと、(B)M遺伝子が劣性ホモ (*mm*) となった柱頭の自家不和合性は抑制されること、(C) *M rs m* 遺伝子は花粉の柱頭への侵入に直接関与すると考えられること、(D)イエローサルソンとミズナ和合系統の差はS遺伝子の活性の有無に起因することを明らかにした。

第四章においては雌ずいを高温で精密に処理する方法を工夫し、高温による自家不和合性解消の問題を検討した。その結果、雌ずいを40℃15分間処理することによって自家不和合性が解消すること、更にこの現象は2時間後には回復すること、その回復のためには処理前の植物体の環境温度が重要で、低温で育成した植物において回復が認められること、また高温処理によって乳頭細胞の膜状態の変化があること、S糖たんぱく質はこの温度で変性しないこと、花粉はこの処理によって活性を失うことなどを明らかにし、この高温の効果も花粉管侵入に直接関与するものと推論した。

以上の実験結果から著者は自家不和合性反応には認識反応と、それに引続く花粉管侵入が遺伝的にも、生理的にも認められ特に花粉管の柱頭侵入に関しては柱頭が重要な働きをしていることを明らかにしている。

以上の研究は、育種技術として用いられる自家不和合性に新しい知見を加えたものであり農学博士の称号を授与するに値するものと判断した。